

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2006年10月19日 (19.10.2006)



PCT



(10) 国际公布号
WO 2006/108358 A1

(51) 国际专利分类号:

A61K 31/7084 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)
A61K 31/7056 (2006.01) A61P 31/18 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 31/20 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01) C07H 21/04 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2006/000667

(22) 国际申请日: 2006年4月13日 (13.04.2006)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

200510064537.5

2005年4月13日 (13.04.2005) CN

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 长春华普生物技术有限公司(CHANGCHUN HUAPU BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) [CN/CN]; 中国吉林省长春市新民大街4-28/1102-54号, Jilin 130021 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 王丽颖(WANG, Li-Ying) [CN/CN]; 中国北京市北辰东路8号汇园公寓N座1401, Beijing 100101 (CN)。包木胜(BAO, Mu-Sheng) [CN/CN]; 中国北京市北辰东路8号汇园公寓N座1401, Beijing 100101 (CN)。于永利(YU, Yong-Li) [CN/CN]; 中国北京市北辰东路8号汇园公寓N座1401, Beijing 100101 (CN)。

(74) 代理人: 中科专利商标代理有限公司(CHINA SCIENCE PATENT & TRADEMARK AGENT LTD); 中国北京市海淀区王庄路1号清华同方科技大厦B座15层, Beijing 100083 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: ANTIVIRAL USE OF ARTIFICIAL CpG-CONTAINING SINGLE-STRANDED OLIGODEOXYNUCLEOTIDES IN COMBINATION WITH RIBAVIRIN

(54) 发明名称: 人工合成的含CpG的单链脱氧寡核苷酸和利巴韦林联合应用产生的抗病毒作用

(57) Abstract: The present invention provides a composition containing ribavirin and artificial CpG single-stranded oligodeoxynucleotides or a kit which can prevent or treat viral infection and infectious diseases caused by virus, and use thereof. The invention also provides a method for preventing or treating viral infection and infectious diseases caused by virus.

(57) 摘要:

本发明提供了一种用于治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的组合物或试剂盒及其应用, 此组合物包含利巴韦林和人工合成的含CpG的单链脱氧核苷酸。本发明还涉及用于治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的方法。

WO 2006/108358 A1

人工合成的含 CpG 的单链脱氧寡核苷酸和 利巴韦林联合应用产生的抗病毒作用

发明领域

5 本发明涉及一种人工合成的含 CpG 的单链脱氧核苷酸和利巴韦林，特别是涉及人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林联合应用，本发明所涉及的的人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林联合应用时可用于病毒感染疾病及病毒感染相关疾病的治疗和预防。本发明所指的病毒包括但不限于流感病毒、口蹄疫病毒、登革热病毒、日本脑炎病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷性病毒和乳头瘤病毒。
10 本发明还提供了的人工合成的单链脱氧核苷酸的序列。

发明背景

CpG ODN 是人工合成的含一个或多个 CpG 二核苷酸的脱氧寡核苷酸单链 DNA，其中的 CpG 是由胞嘧啶和鸟嘌呤通过磷酸连接成的二核苷酸，C 代表胞嘧啶，G 代表鸟嘌呤，p 代表磷酸，胞嘧啶位于 5'端。由于序列尤其是 CpG 两侧的序列的不同，CpG ODN 可有多种多样的形式。有些 CpG ODN 具有明确的免疫调节作用，表现出较好的临床应用价值(Weiner GJ. The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides. J Leukoc Biol 2000 Oct; 68(4): 455-63)。有些 CpG ODN 的作用具有种属特异性，即对一种动物表现生物学
15 作用的 CpG ODN，在另一种动物则未必表现出同样性质或强度的生物学活性 (Gunther Hartmann,et al.Delineation of a CpG Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide for Activating Primate Immune Responses In Vitro and In Vivo I The Journal of Immunology, 2000, 164: 1617-1624)。

根据功能的特点，含 CpG 的单链脱氧核苷酸被分为三种类型：A 型单链脱氧核苷酸 (CpG-A ODN)、B 型单链脱氧核苷酸 (CpG-B ODN) 和 C 型单链脱氧核苷酸 (CpG-C ODN)。主要表现为激活树突状细胞、天然杀伤细胞、刺激树突状细胞分泌干扰素活性的单链脱氧核苷酸 被归类为 A 型单链脱氧核苷酸。A 型单链脱氧核苷酸被期望用于肿瘤、病毒感染性疾病和其它用干扰素治疗的疾病的治疗。主要表现为激活 B 淋巴细胞，增强体液免疫应答活性的单链脱氧核苷酸被归类为
25 B 型单链脱氧核苷酸。B 型单链脱氧核苷酸是一类分子佐剂，可增强疫苗的免疫
30

效果。兼备 A 型单链脱氧核苷酸 和 B 型单链脱氧核苷酸主要活性的单链脱氧核苷酸被归类为 C 型单链脱氧核苷酸。

实验表明, 人工合成的含 CpG 的单链脱氧核苷酸具有抗病毒的生物学活性。经阴道应用人工合成的单链脱氧核苷酸可使小鼠或豚鼠提高抵抗 II 型单纯疱疹病毒 (HSV-2) 的能力 (Richard B. Pyles et al. *Journal of Virology*, November 2002, Vol.76, No. 22 p. 11387-11396)。给小鼠应用人工合成的单链脱氧核苷酸可减少其呼吸道合胞病毒(RSV)的荷量(Cho JY, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2001 Nov;108(5):697-702)。注射人工合成的单链脱氧核苷酸的小鼠在经致死量的 HSV-2 攻击后, 阴道分泌物中病毒滴度明显降低 (Harandi AM, Eriksson K, Holmgren J. *J Virol* 2003 Jan;77(2):953-62)。

利巴韦林 (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide,Ribavirin), 也称 Virazole, 是一种核苷类似物, 具有广谱的抗病毒活性 (Gilbert, B E et al. *Agents Chemother.* 1986, 30(2):201-205) (Streeter DG, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Apr;70(4):1174-8.), 被用于多种病毒感染性疾病的治疗 (Gilbert, B E et al. *Agents Chemother.* 1986, 30(2):201-205)。利巴韦林和α干扰素联合应用是治疗由丙型肝炎病毒感染引起的慢性的丙型肝炎的有效方法 (Davis GL, et al. *N Engl J Med.* 1998 Nov 19;339(21):1493-9.)。利巴韦林和长效α干扰素 (pegylated interferon, peginterferon) 联合应用对治疗丙型肝炎有明显的疗效 (Torriani FJ, et al. *N Engl J Med.* 2004 Jul 29; 351(5) :438-50)。

流感病毒是引起人流感的病原体。在 1918-1919 年, 全世界有两千万人死于流感病毒的流行(Patterson, K. D. & Pyle, G. F. (1991) *Bull. Hist. Med.* 65, 4-213)。接种疫苗和应用抗病毒药物是防治流感病毒的两类主要方法 (Bridges, C. B. et al. (2001) *Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 50, 1-44), 但事实证明, 这两类方法均不能有效地控制流感的流行(Webby, R. J. & Webster, R. G. (2001) *Philos. Trans. R. Soc. London* 356, 1817-1828)。在易感人群, 接种疫苗的短期 (半年) 保护率约为 39% (Fukuda, K., N. J. (1999) *Morbid. Mortal. Wkly. Rep.* 48, 1-28, Castle, S. C. *Clin Infect Dis.* 2000 Aug;31(2):578-85. Epub 2000 Sep 14. Review)。由于流感病毒抗原[血细胞凝集素 (HA)和神经酰胺酶(NA)]性的不断变化, 现行的疫苗几乎每年都要重新改建结构。由于副作用较大和新的抗药流感病毒株不断出现, 一些获得批准的抗流感病毒药物的

效果也不理想(Luscher-Mattli, M. Arch Virol. 2000;145(11):2233-48. Review.)。

丙型肝炎病毒(HCV)是引起丙型肝炎的病原体,在全世界感染了大约1亿七千多万人。肝癌和肝硬化是HCV感染引起的两个严重的并发症。在世界范围内,采用 α -干扰素和利巴韦林联合应用是治疗丙型肝炎病毒感染的方法,其有效率约为40% [Jon Cohen. Science, 1999, 285: 26-30]。丙型肝炎病毒是一种有包膜的单股正链RNA病毒,属黄病毒科病毒。黄病毒科的另外两种病毒是登革热病毒(Wang WK, et al. J Virol. 2002 May;76(9):4662-5.)和日本脑炎病毒(Yun SI, et al. J Virol. 2003 Jun;77(11):6450-65.)。登革热病毒、日本脑炎病毒也是单股正链的RNA病毒。由于尚无研究丙型肝炎病毒的细胞和动物模型,采用登革热病毒、日本脑炎病毒做实验获得的结果可在相当的程度上代表用丙型肝炎病毒做细胞实验获得的结果。

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒引起的烈性传染病。猪、牛、羊都可感染口蹄疫病毒而发生口蹄疫,轻者在口、舌、唇、蹄、乳房等部位出现水泡、破溃及烂斑等病变,重者发生死亡。口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)是口蹄疫的病原体,是小RNA病毒科(Picornaviridae)口蹄疫病毒属(Aphthovirus)的成员,现已发现了7个血清型,即O、A、C型(称欧洲型),SAT1、SAT2、SAT3型(南非1、2、3型,也称非洲型)和AsiaI型(亚洲I型,称亚洲型)。口蹄疫的发生和流行会造成巨大的直接和间接的经济损失[江鹏斐,中国农业科学1999, 32(6):93~100]。国际兽疫局(OIE)将口蹄疫列为A类家畜传染病。世界各国对预防和控制口蹄疫都十分重视。除屠杀感染口蹄疫的家畜外,接种疫苗是预防和控制口蹄疫的主要措施[M. Woolhouse, 2001]。

日本脑炎是由黄病毒属的日本脑炎病毒引起的。大多数人感染日本脑炎病毒后都不会发病。多数发病者临床症状较轻,常见发烧、头痛、恶心、倦怠、腹痛或出现意识障碍及精神症状。重症病例多以突发高烧、头痛、呕吐开始,接着出现脑脊膜刺激现象,3-5日出现痉挛、异常行为、肌强直,意识明显变化甚至昏迷、死亡。

乙型肝炎病毒是乙型肝炎的病原体,为一种DNA病毒。完整的乙型肝炎病毒颗粒直径为42nm,可分为包膜与核心两部分。包膜上的蛋白质称为乙型肝炎表面抗原(HBsAg),它在肝细胞内合成,然后释入血液循环中,本身并无传染性。核心部分含有环状双股的DNA、DNA聚合酶、核心抗原(HBcAg)和e抗原(HBeAg),是病毒复制的主体,并有传染性。

艾滋病是由于感染了人类免疫缺陷病毒(简称 HIV)后引起的一种致死性传染病。HIV 主要破坏人体的免疫系统,使机体逐渐丧失防卫能力而不能抵抗外界的各种病原体。艾滋病病毒(HIV)是带有包膜的 RNA 逆转录病毒,分类上属于逆转录病毒科。HIV 呈球形或卵形,直径 100-130nm,由包膜和核心两个部分组成。包膜蛋白包括外膜糖蛋白(gp120)和跨膜糖蛋白(gp41)。核心部分由核壳蛋白、两个相同拷贝的核酸基因组 RNA 和酶类组成。

目前世界已研制了一些能够有效抑制艾滋病病毒的药物,这些药物已能在某种程度上缓解艾滋病病人的症状,延长患者的生命和提高其生活质量。

乳头瘤病毒属于乳多空病毒科(Papovaviridae)的乳头瘤病毒属,它包括多种动物的乳头瘤病毒和人乳头瘤病毒(Human papillomavirus ,HPV)。HPV是一种小的DNA病毒,直径45~55nm,衣壳呈二十面体立体对称,含72个壳微粒,没有囊膜。HPV基因组是一闭环双股DNA,分子量 5×10^6 道尔顿。按功能可分为早期区(E区)、晚期区(L区)和非编码区(NCR)三个区域。E区分为E1~E7开放阅读框架,主要编码与病毒复制、转录、调控和细胞转化有关的蛋白。L区分L1和L2,分别编码主要衣壳蛋白和次要衣壳蛋白。NCR是E区与L区间-6.4~1.0bp的DNA片段,可负责转录和复制的调控。据流行病学调查资料显示:全球乳头瘤病毒的感染率在9-13%左右,即每年大约有6亿3千万人感染乳头瘤病毒。乳头瘤病毒与很多的皮肤粘膜疾病密切相关。乳头瘤病毒的感染可导致皮肤的扁平疣,生殖器的尖锐湿疣,更为严重的是乳头瘤病毒的感染与宫颈癌、阴茎癌和肛门的癌症密切相关 (L Koutsky. Am J Med, May 5, 1997; 102(5A): 3-8)。另有研究证实,单纯疱疹 II 型病毒和人乳头瘤病毒,是导致宫颈癌的重要生物因子,是生殖系统感染最为常见的病原体。被宫颈单纯疱疹 II 型病毒感染的妇女宫颈癌的发病率高于健康妇女8倍。人乳头瘤病毒导致宫颈癌的危险比单纯疱疹 II 型病毒更大。目前鉴定出的人乳头瘤病毒(HPV)已超过100个型别 (BrownDR. etal. J Clin Microhiol,1999,37(10):3316-3322)。

发明内容

本发明的目的之一是提供一种组合物,其包含人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林,所述人工合成的单链脱氧核苷酸由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成,具有下述结构式(i)-(v)。

本发明的人工合成的含 CpG 的单链脱氧核苷酸 具有下述结构式:

(1) (G)_n(L)_n X₁X₂CGY₁Y₂(M)_n (G)_n

X₁=A,T,G; X₂=A,T; Y₁=A,T; Y₂=A,T,C; L,M=A,T,C,G; n 为 0-6

- 5'-ggggTCgTTCgTCgTTggggg-3' (SEQ ID NO:1)[121]
 5'-ggggATAACgTTgCggggg-3' (SEQ ID NO:2)[143]
 5 5'-ggggTgCAACgTTCAggggg-3' (SEQ ID NO:3)[402]
 5'-ggggTCCTACgTAggAggggg-3' (SEQ ID NO:4)[123]
 5'-ggggTCCATgACgTTCCTgAAggggg-3' (SEQ ID NO:5)[603]
 5'-gggggACgTCgCCggggg-3' (SEQ ID NO:6)[118]
 5'-ggATCCgTACgCATggggg-3' (SEQ ID NO:7)[320]
 10 5'-gggggAATCgATTCggggg-3' (SEQ ID NO:8)[154]
 5'-gggATgCATCgATgCATCggggg-3' (SEQ ID NO:9)[464]
 5'-ggTgCgACgTCgCAggggg-3' (SEQ ID NO:10)[471]
 5'-gggACgTACgTCggggg-3' (SEQ ID NO:11)[390]
 5'-gggggATCgACgTCgATCggggg-3' (SEQ ID NO:12)[322]
 15 5'-ggCgATCgATCgATCggggg-3' (SEQ ID NO:13)[333]
 5'-ggggTCgATCgATCgAggggg-3' (SEQ ID NO:14)[113]
 5'-ggTCgCgATCgCgAggggg-3' (SEQ ID NO:15)[307]
 5'-ggGGTCAACGTTGAgggggG-3' (SEQ ID NO:16)[156]
 5'-gTCgTTTTTCgTCgACgAATTggggggg-3' (SEQ ID NO:17)[222]
 20 5'-gTCgTTATCgTTTTTTCgTAggggg-3' (SEQ ID NO:18)[151]
 5'-ggCgTTAACgACggggg-3' (SEQ ID NO:19)[288]
 5'-gTCggCACgCgACggggg-3' (SEQ ID NO:20)[157]
 5'-ggTgCgACgTCgCAggggg-3' (SEQ ID NO:21)[312]
 5'-gTCTATTTTgTACgTACgTgggg-3' (SEQ ID NO:22)[360]
 25 5'-gACgTCgACgTCgACgTCAggggg-3' (SEQ ID NO:23)[209]
 5'-ggggTCgATCgTTgCTAgCggggg-3' (SEQ ID NO:24)[399]
 5'-gggggACgTTATCgTATTgggggg-3' (SEQ ID NO:25)[600]
 5'-ggggTCgTCgTTTgTCgTgTgTCgTTggggg-3' (SEQ ID NO:26)[408]
 5'-ACgATCgATCgATCggggg-3' (SEQ ID NO:27)[304]
 30 5'-AgACgTCTAACgTCggggg-3' (SEQ ID NO:28)[301]

5'-ggggTgCTggCCgTCgTTgggggg-3' (SEQ ID NO:29)[266]

5'-ggggTCgTTgCCgTCgggggg-3' (SEQ ID NO:30)[248]

5'-ACCggTATCgATgCCggTgggggg-3' (SEQ ID NO:31)[389]

5'-TTCgTTgCATCgATgCATCgTTgggggg-3' (SEQ ID NO:32)[287]

5

(2) (G)_n(L)_nCG(XY)_nCG(M)_n(G)_n

X=A,T; Y=A,T; L,M=A,T,C,G; n 为 0-6

5'-ggggACgATACgTCgggggg-3' (SEQ ID NO:33)[546]

5'-ggggACgATATCgATgggggg-3' (SEQ ID NO:34)[1007]

10 5'-ggACgATCgATCgTgggggg-3' (SEQ ID NO:35)[521]

5'-TCggggACgATCgTCgggggg-3' (SEQ ID NO:36)[667]

5'-gggggATCgATATCgATCgggggg-3' (SEQ ID NO:37)[576]

5'-ggATCgATCgATCgATgggggg-3' (SEQ ID NO:38)[268]

5'-ggTgCATCgATCgATgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:39)[101]

15 5'-ggTgCATCgTACgATgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:40)[100]

5'-ggTgCgATCgATCgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:41)[134]

5'-gggggggTCgATCgATgggggg-3' (SEQ ID NO:42)[519]

5'-ggggTCgTCgAACgTTgggggg-3' (SEQ ID NO:43)[350]

5'-TgTCgTTCCTTgTCgTT-3' (SEQ ID NO:44)[387]

20 5'-TTCgCTTCgCTTTTCgCTTCgCTT-3' (SEQ ID NO:45)[212]

5'-ACCGCCAaggAgAAgCCgCAggAggg-3' (SEQ ID NO:46)[166]

5'-TACAACggCgAggAATACC-3' (SEQ ID NO:47)[176]

5'-gTACAACggCgAggAATACCT-3' (SEQ ID NO:48)[523]

5'-ACCGTCgTTgCCgTCggCCC-3' (SEQ ID NO:49)[230]

25 5'-TgCTggCCgTCgTT-3' (SEQ ID NO:50)[435]

5'-gTCggCACgCgACg-3' (SEQ ID NO:51)[325]

5'-gTCggCACgCgACgCCCCC-3' (SEQ ID NO:52)[523]

5'-TCCCgCTggACgTT-3' (SEQ ID NO:53)[188]

5'-TTACCggTTAACgTTggCCggCC-3' (SEQ ID NO:54)[403]

30 5'-ACCGgTTAACgTTgTCCCCgggg-3' (SEQ ID NO:55)[420]

- 5'-CgTTgACgATCgTCCCATggCggg-3' (SEQ ID NO:56)[104]
 5'-TCTgCggCCTTCgTCg-3' (SEQ ID NO:57)[257]
 5'-TAgTAACCGgTCCggCgCCCC-3' (SEQ ID NO:58)[221]
 5'-TTgCAgCgCTgCCggTggg-3' (SEQ ID NO:59)[611]
 5 5'-CggCCCATCgAgggCgACggC-3' (SEQ ID NO:60)[378]
 5'-TCATCgACTCTCgAgCgTTC-3' (SEQ ID NO:61)[599]
 5'-ATCgTCgACTCTCgTgTTCTC-3' (SEQ ID NO:62)[201]
 5'-TgCAgCTTgCTgCTTgCTgCTTC-3' (SEQ ID NO:63)[153]
 5'-ggTgCgACgTCgCAgATgAT-3' (SEQ ID NO:64)[116]
 10 5'-ggTCgAACgTTCgAgATgAT-3' (SEQ ID NO:65)[133]
 5'-gggggCgTCgTTTTTCgTCgACgAATT-3' (SEQ ID NO:66)[278]
 5'-actcgagacgcccgttagatgctt-3' (SEQ ID NO:67)355[244]
 5'-AACgTTggCgTCgACgTCAgCgCC-3' (SEQ ID NO:68)[623]
 5'-gACgTCgACgTTgACgCT-3' (SEQ ID NO:69)[485]
 15 5'-ggCgTTAACgTTAgCgCT-3' (SEQ ID NO:70)[579]
 5'-AgCgCTAgCgCTgACgTT-3' (SEQ ID NO:71)[232]
 5'-CTAgACgTTCAAgCgTT-3' (SEQ ID NO:72)[233]
 5'-gACgATCgTCgACgATCgTC-3' (SEQ ID NO:73)[344]
 5'-gTCgTTCgTAgTCgACTACgAgTT-3' (SEQ ID NO:74)[379]
 20 5'-AAAACgACgTCgACgTCgACgTCTTTT-3' (SEQ ID NO:75)[489]
 5'-TgCgACgATCgTCgCACgATCggAT-3' (SEQ ID NO:76)[479]
 5'-TgCgACgTCgCACAgCgT-3' (SEQ ID NO:77)[492]

(3) (TCG)_n(L)_nCG (M)_n(G)_n

25 L,M=A,T,C,G; n 为 0-6

- 5'-TCgTTgCCgTCgg-3' (SEQ ID NO:78)[619]
 5'-TCgTTgCCgTCggg-3' (SEQ ID NO:79)[577]
 5'-TCgTTgCCgTCgggg-3' (SEQ ID NO:80)[533]
 5'-TCgTTgCCgTCggggg-3' (SEQ ID NO:81)[537]
 30 5'-TCgTTgCCgTCgggggg-3' (SEQ ID NO:82)[481]

- 5'-TCgTTgCCgTCggggggg-3' (SEQ ID NO:83)[177]
5'-TCgTTgCCgTCggggggg-3' (SEQ ID NO:84)[111]
5'-TCgTTgCCgTCggggggg-3' (SEQ ID NO:85)[105]
5'-TCgTCgggTgCATCgATgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:86)[664]
5 5'-TCgTCgggTgCAACgTTgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:87)[564]
5'-TCgTCgggTgCgTCgACgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:88)[542]
5'-TCgTCgggTgCgATCgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:89)[450]
5'-TCgTCgggTgCgACgATCgTCgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:90)[465]
5'-TCgTCgTgCgACgTCgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:91)[498]
10 5'-TCgTCgCAgAACgTTCTgggggg-3' (SEQ ID NO:92)[527]
5'-TCgTgCgACgTCgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:93)[112]
5'-TCgTgCgACgATCgTCgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:94)[178]
5'-TCgTATgCATCgATgCATAgggAgg-3' (SEQ ID NO:95)[410]
5'-TCgTgCATCgATgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:96)[444]
15 5'-TCgAAACgTTTCgggggg-3' (SEQ ID NO:97)[532]
5'-TCggACgATCgTCgggggg-3' (SEQ ID NO:98)[598]
5'-TCgAgCgATCgCTCgAgggggg-3' (SEQ ID NO:99)[555]
5'-TCgTCgCTTTgTCgTTgggg-3' (SEQ ID NO:100)[418]
5'-TCgTCgTTTTgTCgTTgggg-3' (SEQ ID NO:101)[208]
20 5'-TCgTCgggTgCgACgTCgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:102)[302]
5'-TCgTCgggTgCgACgATCgTCgggggg-3' (SEQ ID NO:103)[290]
5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAgggggg-3' (SEQ ID NO:104)[627]
5'-TCgTCgTTTTgACgATCgTCgggggg-3' (SEQ ID NO:105)[500]
5'-TCgTTCggggTgCCg-3' (SEQ ID NO:106)[103]
25 5'-TCgTTCggggTACCgATgggg-3' (SEQ ID NO:107)[578]
5'-TCgTTgCgCTCCCATgCCgggggg-3' (SEQ ID NO:108)[319]
5'-TCgTCgTTTCgTCgTTgggg-3' (SEQ ID NO:109)[647]
5'-TCgTTgTCgTTTCgCTgCCggCggggg-3' (SEQ ID NO:110)[417]
5'-TgCTTgggTggCAgCTgCCAgggggg-3' (SEQ ID NO:111)[427]
30 5'-TgCTgCTTTgCTgCTTgggg-3' (SEQ ID NO:112)[421]

5'-AACgTTCgACgTCgAACggggggg-3' (SEQ ID NO:113)[453]

5'-AACgACgACgTTggggg-3' (SEQ ID NO:114)[580]

(4) (TCG)_n(L)_nX₁X₂CG (M)_n

X₁=A,T,G; X₂=A,T; L,M=A,T,C,G; n 为 0-6

5 设计序列如下:

5'-TCgTAACgTTgTTTTTAACgTT-3' (SEQ ID NO:115)[470]

5'-TCgTCgTATACgACgATCgTT-3' (SEQ ID NO:116)[502]

5'-TCgTCgTTTgCgTTgTCgTT-3' (SEQ ID NO:117)[601]

5'-TCCTgTCgTTTTgTCgTT-3' (SEQ ID NO:118)[625]

10 5'-TCgTCgTTgTCgTTCgCT-3' (SEQ ID NO:119)[430]

5'-TCgTCgTTACCgATgACgTCgCCgT-3' (SEQ ID NO:120)[480]

5'-TCgTCgTTTgCATCgATgCAGTCgTCgTT-3' (SEQ ID NO:121)[108]

5'-TCgCCTCgTCgCCTTCgAgCg-3' (SEQ ID NO:122)[102]

5'-TCgTgTgCgTgCCgTTgggT-3' (SEQ ID NO:123)[406]

15 5'-TCgTCgAgggCgCCggTgAC-3' (SEQ ID NO:124)[560]

5'-TCgTCgCCggTgggggTgTg-3' (SEQ ID NO:125)[629]

5'-TCgTCgTACgCAATTgTCTT-3' (SEQ ID NO:126)[440]

5'-TCgCCCACCggTggggggg-3' (SEQ ID NO:127)[207]

5'-TCgTCgCAGACCggTCTgggg-3' (SEQ ID NO:128)[615]

20 5'-TCgTCgCggCCggCgCCCCC-3' (SEQ ID NO:129)[610]

5'-TCgTCgCggCCgCgAggggg-3' (SEQ ID NO:130)[206]

5'-TCgAggACAAGATTCTCgTgC-3' (SEQ ID NO:131)[119]

5'-TCgAggACAAGATTCTCgTgCaggCC-3' (SEQ ID NO:132)[570]

5'-TCgTgCaggCCAACgAggCCg-3' (SEQ ID NO:133)[631]

25 5'-TCgTTgCCgTCggCCC-3' (SEQ ID NO:134)[115]

5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTTTCC-3' (SEQ ID NO:135)[370]

5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCCCCC-3' (SEQ ID NO:136)[309]

5'-TCgTTgCCgTCggCCCCC-3' (SEQ ID NO:137)[506]

5'-TCgTTgCCgTCggCCCCC-3' (SEQ ID NO:138)[404]

30 5'-TCgTTgCCgTCggCCCC-3' (SEQ ID NO:139)[203]

- 5'-TCgTTgCCgTCggCCCCCCC-3' (SEQ ID NO:140)[501]
5'-TCgAggACAAgATTCTCgT-3' (SEQ ID NO:141)[305]
5'-TCggCACgCgACgTgCTggCCgTCgTT-3' (SEQ ID NO:142)[509]
5'-TCgTCgCgCCgTCACggggggg-3' (SEQ ID NO:143)[630]
5 5'-TCgTgTgCgTgCCgTTggg-3' (SEQ ID NO:144)[106]
5'-TCgTCgCCgTTgggCggg-3' (SEQ ID NO:145)[117]
5'-TCgTCgACgTCgTTgggCggg-3' (SEQ ID NO:146)[280]
5'-TCgCAgTTgTCgTAACgTTgggCggg-3' (SEQ ID NO:147)[205]
5'-TCgTCgTTggTATgTT-3' (SEQ ID NO:148)[613]
10 5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTT-3' (SEQ ID NO:149)[306]
5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTTgggg-3' (SEQ ID NO:150)[640]
5'-TCgTTCggggTgCCg-3' (SEQ ID NO:151)[409]
5'-TCgTTCggggTAACgATT-3' (SEQ ID NO:152)[508]
5'-TCgTTCggggTAACgTT-3' (SEQ ID NO:153)[540]
15 5'-TCgTTCggggTACCgAT-3' (SEQ ID NO:154)[401]
5'-TCgTACggCCgCCgTACggCggg-3' (SEQ ID NO:155)[607]
5'-TCgCgTCgACTCCCCTCgAgggg-3' (SEQ ID NO:156)[380]
5'-TCgTCgTCgACTCgTggTCggggg-3' (SEQ ID NO:157)[656]
5'-TCgggCgCCCgATCgggggg-3' (SEQ ID NO:158)[310]
20 5'-TCgTCggTCTTTCgAAATT-3' (SEQ ID NO:159)[109]
5'-TCgTgACgTCCTCgAgTT-3' (SEQ ID NO:160)[330]
5'-TCgTCTTTCgACTCgTTCTC-3' (SEQ ID NO:161)[605]
5'-TCgTCgTTTTgCgTTCTC-3' (SEQ ID NO: 162)[504]
5'-TCgACTTTCgTCgTTCTgTT-3' (SEQ ID NO:163)[407]
25 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTCTC-3' (SEQ ID NO:164)[550]
5'-TCgTCgTCgTCgTTgTCgTT-3' (SEQ ID NO:165)[612]
5'-TCGTCGGGTGCGACGTCGCA-3' (SEQ ID NO:186)
5'-TCgTTCTCgACTCgTTCTC-3' (SEQ ID NO:166)[277]
5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3' (SEQ ID NO:167)[684]
30 5'-TCgTCgACgTCgTTCgTTCTC-3' (SEQ ID NO:168)[685]

- 5'-TCgTgCgACgTCgCAgATgAT-3' (SEQ ID NO:169)[114]
 5'-TCgTCgAgCgCTCgATCggAT-3' (SEQ ID NO:170)[211]
 5'-TCgTCgTTTCgTAgTCgTTgACgTCggg-3' (SEQ ID NO:171)[204]
 5'-TCgTCggACgTTTTCCgACgTTCT-3' (SEQ ID NO:172)[308]
 5 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTTCgTCgTT-3' (SEQ ID NO:173)[340]
 5'-TCgTCgTTTgTCgTgTgTCgTT-3' (SEQ ID NO:174)[503]
 5'-TCgTCgTTggTCggggTCgTTggggTCgTT-3' (SEQ ID NO:175)[405]
 5'-TCgTCgTTTCgTCTCTCgTT-3' (SEQ ID NO:176)[614]
 5'-TCgTCgTTTTgCTgCgTCgTT-3' (SEQ ID NO:177)[505]
 10 5'-TCgAgCgTTTTTCgCTCgAATT-3' (SEQ ID NO:178)[530]

(5) 包含 **TTCGTCG** 的序列

- 5'-TTCgTCgTTTgATCgATgTTCgTTgggggg-3' (SEQ ID NO:179)[507]
 5'-TTCgTCgTTgTgATCgATgggggg-3'-3' (SEQ ID NO:180)[210]
 5'-TATCgATgTTTTTCgTCgTCgTTgggggg-3' (SEQ ID NO:181)[202]
 15 5'-TCgACTTTCgTCgTTCTgTT-3' (SEQ ID NO:182)[303]
 5'-TCgTCgTTTCgTCgTTCTC-3' (SEQ ID NO:183)[491]
 5'-TCgACgTTCgTCgTTCgTCgTTC-3' (SEQ ID NO:184)[590]
 5'-TCgTCgTTTTTCgTCgTTTTTCgTCgTT-3' (SEQ ID NO:185)[633]

优选地, 本发明的人工合成含 CpG 的的单链脱氧核苷酸 具有如下所示的序列:

- | | | |
|----|--|---------------|
| 20 | CpG ODN 1: 5'-ggggacgatatcgatgggggg-3' | SEQ ID NO 34 |
| | CpG ODN 2: 5'-ggggtcgttcgtcgttgggggg-3' | SEQ ID NO 1 |
| | CpG ODN 3: 5'-ggggtgcaacgttcagggggg-3' | SEQ ID NO 3 |
| | CpG ODN 4: 5'-tcgtgcgacgatcgtcgagggggg-3' | SEQ ID NO 94 |
| | CpG ODN 5: 5'-tcgagcgatcgctcgagggggg-3' | SEQ ID NO 99 |
| 25 | CpG ODN 6: 5'-ggggtgctggccgctgttgggggg-3' | SEQ ID NO 29 |
| | CpG ODN 7: 5'-tcgaaacgtttcgggggg-3' | SEQ ID NO 97 |
| | CpG ODN 8: 5'-tcgtcgggtgcgacgtcgagggggg-3' | SEQ ID NO 102 |
| | CpG ODN 9: 5'-tcggacgatcgtcgggggg-3' | SEQ ID NO 98 |
| | CpG ODN 10: 5'-tcgtcgggtgcgatcgagggggg-3' | SEQ ID NO 89 |
| 30 | CpG ODN 11: 5'-tcgtgcgacgtcgcatgat-3' | SEQ ID NO 169 |

	CpG ODN 12: 5'-tcgtatgcatcgatgcatagggagg-3'	SEQ ID NO 95
	CpG ODN 13: 5'-tcgtcgtttcgtcgttgggg-3'	SEQ ID NO 109
	CpG ODN 14: 5'-tcgtcgggtgcatcgatgcagggggg-3'	SEQ ID NO 86
	CpG ODN 15: 5'-tcgtcgcagaacgttctgggggg-3'	SEQ ID NO 92
5	CpG ODN 16: 5'-tcgtcgggtgcgacgtcgca-3'	SEQ ID NO 186
	CpG ODN 17: 5'-gtcgttttcgtcgacgaattggggggg-3'	SEQ ID NO 17
	CpG ODN 18: 5'-tcgtcgtcgactcgtggtcggggg-3'	SEQ ID NO 157
	CpG ODN 19: 5'-tcggggacgatcgtcgggggg-3'	SEQ ID NO 36
	CpG ODN 20: 5'-gggggcgtcgttttcgtcgacgaatt-3'	SEQ ID NO 66

10

本领域的普通技术人员基于说明书的教导，结合本领域的公知常识，完全可以确定上述人工合成的单链脱氧核苷酸均可以用于实现本发明的目的。

本发明所述的人工合成的单链脱氧核苷酸 可通过已知的方法生产，例如采用固相亚磷酰胺三酯法进行生产。在以下的实施例中详细地例举了一种生产本发明的人工合成的含 CpG 单链脱氧寡核苷酸的方法。

本发明的目的之一是提供一种用于治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的组合物，此组合物包含利巴韦林和人工合成的含 CpG 的单链脱氧核苷酸。所述人工合成的单链脱氧核苷酸由含一个或多个 CpG 的寡核苷酸单链 DNA 分子构成，具有公式(i)-(v)之一包含的序列。人工合成的含 CpG 的单链脱氧核苷酸的磷酸二酯键是非硫化的，部分硫化的或完全硫化的，并可被化学修饰。

本发明的目的之二是提供一种联合应用人工合成的含 CpG 的单链脱氧核苷酸和利巴韦林治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的方法，采用的人工合成的含 CpG 的单链脱氧核苷酸的磷酸二酯键是非硫化的，部分硫化的或完全硫化的，并可被化学修饰。

本发明的目的之三是提供对病毒感染和病毒感染相关性疾病的一种治疗方法，其包含向需要该治疗的患者施用治疗有效量的具有结构式(i)-(v)之一序列的人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林。两者可以同时、顺序或分开施用。所述病毒是指 RNA 病毒，DNA 病毒和逆转录病毒，包括但不限于流感病毒、口蹄疫病毒、登革热病毒、日本脑炎病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷性病毒和乳头瘤病毒。

在预防和治疗病毒感染和病毒感染引发的疾病时，这些人工合成的单链脱氧核苷酸的单次应用剂量为1-5000微克。利巴韦林的单次应用剂量为300-10000毫克。

人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林的应用方式包括粘膜表面（包括呼吸道、消化道和泌尿生殖道黏膜）应用，皮下、肌肉注射应用，胃肠应用，腹腔应用，静脉注射等方式应用。

本发明的目的之四是提供一种治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的方法，其包含向需要该治疗的患者施用治疗有效量的上述组合物。

本发明的目的之五是提供上述组合物在制备用于治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的药物中的应用。

本发明中人工合成的单链脱氧核苷酸的磷酸二酯键可以是非硫化的，部分硫化的，也可以是完全硫化的。人工合成的单链脱氧核苷酸可以是经化学修饰的。其中所述化学修饰对于本领域的普通技术人员而言是公知的。

在本发明中，所述病毒包括，但不限于由流感病毒、口蹄疫病毒、登革热病毒、日本脑炎病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷性病毒和乳头瘤病毒。

另外，需要指出的是，在本申请的上下文的公开内容的基础上，本发明的其它具有实质性特点的方面和创造性的有益效果对本领域的普通技术人员来说是可以直接推知的。

具体实施方式

在本发明的上下文中，所使用的术语除非另外说明，一般具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。

下面结合具体的制备实施例和生物学效果实施例进一步详细地描述本发明。应理解，这些实施例只是为了举例说明本发明，而非以任何方式限制本发明的范围。

实施例

在如下实施例中，未详细描述的各种过程和方法是本领域中公知的常规方法，例如合成采用固相亚磷酰胺三酯法。

在如下实施例中，所用试剂的来源、商品名和/或有必要列出其组成成分者，

均只标明一次。在其后所用相同试剂如无特殊说明，不在赘述上述内容。

实施例 1. 人工合成的单链脱氧核苷酸的制备

采用固相亚磷酰胺三酯法合成人工合成的单链脱氧核苷酸

5

1) 脱保护基

用三氯乙酸(Trichloroacetic Acid, TCA)脱去连结在可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass)上的核苷酸的保护基团二甲氧基三苯甲基 (DMT)，获得游离的 5'-羟基端，以供下一步缩合反应。

10 2) 活化

将亚磷酰胺保护的核苷酸单体与四氮唑活化剂混合并进入合成柱，形成亚磷酰胺四唑活性中间体(其 3'-端已被活化，但 5'-端仍受 DMT 保护)，此中间体将与可控多孔玻璃上的已脱保护基的核苷酸发生缩合反应。

3) 连接

15 亚磷酰胺四唑活性中间体遇到可控多孔玻璃上已脱保护基的核苷酸时，将与其 5'-羟基发生亲合反应，缩合并脱去四唑，此时合成的寡核苷酸链向前延长一个碱基。

4) 封闭

缩合反应后为了防止连在可控多孔玻璃上的未参与反应的 5'-羟基在随后的循环反应中被延伸，常通过乙酰化来封闭此端羟基，一般乙酰化试剂是用乙酸酐和 N-甲基咪唑等混合形成的。

20

5) 氧化

缩合反应时核苷酸单体是通过亚磷酸酯键与连在可控多孔玻璃上的寡核苷酸连接，而亚磷酸酯键不稳定，易被酸、碱水解，此时常用碘的四氢呋喃溶液将亚磷酸酯转化为磷酸三酯，得到稳定的寡核苷酸。

25

经过以上五个步骤后，一个脱氧核苷酸就被连到可控多孔玻璃的核苷酸上，同样再用三氯乙酸脱去新连上的脱氧核苷酸 5'-羟基上的保护基团 DMT 后，重复以上的活化、连接、封闭、氧化过程即可得到一个 DNA 片段粗品。最后对其进行切割、脱保护基(一般对 A、C 碱基采用苯甲酰基保护；G 碱基用异丁酰基保护；T 碱基不必保护；亚磷酸用脍乙基保护)、纯化(常用的有 HAP, PAGE, HPLC, C18, OPC
30 等方法)、定量等合成后处理即可得到符合实验要求的寡核苷酸片段。

未硫化的人工合成的单链脱氧核苷酸在 ABI 3900 DNA 合成仪上合成; 全硫化及部分硫化 CpG 单链脱氧寡核苷酸的合成采用置换法, 在 ABI 394 DNA 合成仪上合成。

实施例 2、实施例 3、实施例 4、实施例 5、实施例 6 中使用的人工合成的单链
5 脱氧核苷酸为上述 CpG ODN 1-20。

实施例 2. 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的抗滤泡口炎病毒作用比较

1、滤泡口炎病毒 (VSV) 的扩增

10 1) 仪器设备和材料: 低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管等。

2) IMDM 培养基: 含 L-谷氨酰胺的 IMDM(GIBCOBRL) 10.4 克, 2.0 克碳酸氢钠, 10 万单位庆大霉素, 加三蒸水至体积 1000 毫升。0.22 微米的滤膜真空泵抽滤除菌、分装。

15 3) 方法: 用含 10% 小牛血清(Invitrogen, 经 56℃30 分钟处理)的 IMDM 培养基培养 Vero E6 细胞(购自上海细胞所)。在 100ml 培养瓶中长成单层后, 更换培养液。加入含滤泡口炎病毒 (VSV) (长春生物制品所) 的培养液, 其含量为 10TCID₅₀。设无病毒对照。约 24-48 小时后, 感染 VSV 的 Vero E6 细胞全部发生病变, 收集病变细胞和上清, 将其置 -20℃ 过夜。次晨, 将其融解, 用吸管猛烈吹打, 离心收取
20 上清。在测定 TCID₅₀ 后, 将上清贮存于 -20℃ 备用。

2、滤泡口炎病毒 (VSV) TCID₅₀ 的测定

1) 仪器设备和材料: 同上。

2) IMDM 培养基: 同上。

3) 含 10% 小牛血清的 IMDM 培养基: 10 毫升小牛血清(Invitrogen, 经 56℃ 30
25 分钟处理), 90 毫升 IMDM 培养基。

4) 0.5% 结晶紫染液: 结晶紫 0.5 克, NaCl 0.85 克, 溶于 50 毫升无水乙醚。加 3 毫升甲醛, 47 毫升蒸馏水。

5) 结晶紫脱色液: 50 毫升乙二醇单甲醚与 50 毫升蒸馏水混合。

6) 0.25% 胰蛋白酶 (Trypsin)

30 7) 方法: 用 0.25% 胰蛋白酶消化生长良好的 Vero E6 细胞, 3-5 分钟。离心

(1000rpm, 5 分钟)洗涤细胞。用 10% 小牛血清的 IMDM 培养基调细胞浓度为 4×10^5 个 / 毫升。加细胞悬液于 96 孔平底培养板 (Costar), 每孔 100 微升, 设三个复孔。37°C CO₂ 孵箱培养 24 小时后, 细胞形成单层。更换培养液, 其中含倍比稀释的待
5 滴定 VSV (长春生物制品所)。设无 VSV 对照。24 小时后, 用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液, 每孔加 200 μ l 0.5% 结晶紫染液, 37°C, 15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。每孔加入 200 μ l 结晶紫脱色液, 振荡器振荡, 使染料完全从细胞内脱出, 用分光光度计在 540nm 波长处比色(Cytokines. A practical approach, second edition, edited by F.R.BALKWILL. The practical approach series.)。以出现 50% 细胞病变的病毒稀释度的倒数 $\times 10$ 为此病毒液的 TCID₅₀ / 毫升数值。

10

3、人外周血单个核细胞的分离

1) 仪器设备和器材: 低温冰箱、二氧化碳孵箱、超净工作台、倒置显微镜、液氮罐、蒸馏水器、真空泵、细胞培养瓶、滤菌器、滤过瓶、各种规格的吸管、加样器、滴管、血球计数板、水平式离心机等。

15 2) 试剂和材料: 肝素抗凝的人全血购自长春市中心血站。聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液: 比重 1.077 ± 0.001 , 购自北京鼎国生物技术有限公司。IMDM 培养液: 同上。

3) 方法: 用聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液 (北京鼎国生物技术有限公司) 分离人外周血的单个核细胞。分层液与肝素抗凝外周血的体积比约为 2:1。水平离心
20 ($1,000 \times g$, 20min)。用吸管吸取含单个核细胞的液带, 置入另离心管中。加入等体积的无血清培养液。 $1,000 \times g$ 离心 15min, 弃上清。重复洗涤两次。弃上清, 用 2ml 培养液重悬细胞, 并进行细胞计数。

4、人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用抗 25 滤泡口炎病毒的作用的测定

用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养基调人外周血单个核细胞 (PBMC) 的终浓度为 3×10^6 个 / 毫升。加细胞悬液于 12 孔培养板, 每孔 2 ml。分别加 CpG ODN(1-20) 至终浓度 6 μ g/ml。37°C, 5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时, 收集上清。

设立 CpGODN 组、利巴韦林组、CpG ODN+利巴韦林组、IMDM 对照组。将生
30 长状态良好的 Vero E6 细胞接种于 96 孔培养板, 每孔 1.3×10^4 个细胞, 37°C、5%

CO₂ 培养 24 小时后,CpGODN 组加入 1:100 稀释的 CpG ODN 刺激的人 PBMC 培养上清, 利巴韦林组加入利巴韦林 (至终浓度 10 μmol/l), CpGODN+利巴韦林组加入 1: 100 稀释的 CpG ODN 刺激的人 PBMC 培养上清和利巴韦林 (至终浓度 10 μmol/l) (浙江诚意药业有限公司), IMDM 组只加入等量 IMDM。继续培养 1.5 小时
5 小时后, 加入 250 TCID₅₀ / ml 的 VSV 病毒, 同时设正常 VERO 细胞对照组, 培养 44 小时。用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液。每孔加 200 μl 0.5 % 结晶紫染液, 37℃, 孵育 15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。每孔加入 200 微升结晶紫脱色液, 振荡器振荡, 使染料完全从细胞内脱出, 用分光光度计在 540nm 波长测定分光光度值。

10

5、结果: CpG ODN 组和 CpG ODN 与利巴韦林联合应用组相比较, CpG ODN 与利巴韦林联合应用组的 OD 值显著地高于 CpG ODN 组, 这一结果说明, 人工合成的单链脱氧核苷酸具有明显的抗病毒作用, 人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林联合应用具有更显著的抗病毒作用。两组间的 OD 值比较见表 1。

15

实施例 3 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸 N 与利巴韦林联合应用的抗流感病毒作用比较

1、人外周血单个核细胞的分离

1) 仪器设备和器材: 同实施例 2 的部分 3(1)。

20

2) 试剂和材料: 肝素抗凝的人全血购自长春市中心血站。聚蔗糖-泛影葡胺: 比重 1.077±0.001, 购自北京鼎国生物技术有限公司。DMEM 培养液:1000 ml 含庆大霉素 10 万单位。0.22 微米的滤膜抽滤除菌、分装。

3) 方法: 用聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液分离人外周血的单个核细胞。分层液与肝素抗凝外周血的体积比约为 2:1。水平离心 (1,000 ×g, 20min)。用吸管
25 吸取含单个核细胞的液带, 置入另离心管中。加入等体积的无血清培养液。1,000 g 离心 15min, 弃上清。重复洗涤两次。弃上清, 用 2ml 培养液重悬细胞, 并进行细胞计数。

2、人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的
30 抗流感病毒作用测定

用 DMEM 培养液调人外周血单个核细胞的终浓度为 3×10^6 个 / 毫升。加此细胞悬液于 12 孔培养板, 每孔 2 ml。加入人工合成的单链脱氧核苷酸 至终浓度 $6 \mu\text{g/ml}$ 。37°C, 5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时, 收集上清, 检测其抗流感病毒的活性。

设立 CpGODN 组、利巴韦林组、CpGODN+利巴韦林组、DMEM 对照组。用 0.3%BSA DMEM 调节生长状态良好的 Vero E6 细胞浓度至 3×10^5 个/ml。将细胞接种于 96 孔平底培养板, 每孔 1.3×10^4 个细胞, 37°C 和 5% CO_2 培养 24 小时后, CpG 组加入 1:100 稀释的人工合成的单链脱氧核苷酸刺激的人 PBMC 培养上清, 利巴韦林组加入利巴韦林 (至终浓度 $10 \mu\text{mol/l}$), CpG+利巴韦林组加入 1: 100 稀释的人工合成的单链脱氧核苷酸刺激的人 PBMC 培养上清和利巴韦林 (至终浓度 $10 \mu\text{mol/l}$) (浙江诚意药业有限公司), DMEM 组只加入等量 DMEM。继续培养 1.5 小时后, 每孔加入 0.3%BSA DMEM($4 \mu\text{g/ml}$ 胰酶) 稀释的流感病毒液 (长春生物制品研究所) 200 μl , 同时设正常 VERO 细胞对照。37°C、5% CO_2 孵箱培养 44 小时, 用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液。每孔加 200 μl 0.5% 结晶紫染液, 37°C, 15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。每孔加入 200 微升结晶紫脱色液, 振荡器振荡, 使染料完全从细胞内脱出, 用分光光度计在 540nm 波长测定分光光度值。

3 结果: CpG ODN 组和 CpG ODN 与利巴韦林联合应用组相比较, CpG ODN 与利巴韦林联合应用组的 OD 值显著地高于 CpG ODN 组, 这一结果说明, 人工合成的单链脱氧核苷酸具有明显的抗流感病毒作用, 人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林联合应用具有更显著的抗流感病毒作用。两组间的 OD 值比较见表 2。

实施例 4. 人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林抗流感病毒的小鼠体内实验

1 材料: 雌性昆明鼠, 14—16 克, 6-8 周龄, 吉林大学动物室提供。流感病毒 H1N1 型肺适应株 (FM1) 购自长春生物制品所。

2 方法: 设立正常小鼠对照、模型对照组 (阴性对照组)、利巴韦林组、CpGODN 组、利巴韦林加 CpG ODN 组。CpGODN 组小鼠皮下注射人工合成的单链脱氧核苷酸 80 μg (CpG ODN 1—20), 48 小时后, 将流感病毒用 0.3%BSA DMEM 稀释至 10 LD_{50} , 除正常小鼠对照组外, 其它各组小鼠经乙醚麻醉后, 鼻腔给予 20 μl 的 10

LD₅₀ 的流感病毒。2 小时后, 采用灌胃的方法给予利巴韦林组小鼠, 50mg 利巴韦林/kg 体重, 每只小鼠 0.2-0.4ml, 每日 3 次。采用皮下注射的方式给予 CpGODN 组小鼠 80 μg CpG ODN, 每两天注射一次。利巴韦林加 CpGODN 组, 给予利巴韦林和 CpGODN, 给药剂量和给药方式同利巴韦林组和 CpGODN 组。4 天后, 解剖小鼠, 取肺, 称重, 判定肺部病变指数。肺部病变指数(Biochemical and Biophysical Research Communications 279, 158-161 (2000). Inhibitory Effects of an Antisense Oligonucleotide in an Experimentally Infected Mouse Model of Influenza A Virus.)判定指标:

	—	未有明显病变
10	+	25%肺组织发生病变
	++	25—50%肺组织发生病变
	+++	50—75%肺组织发生病变
	++++	>75%肺组织发生病变

3. 结果: CpGODN+利巴韦林组小鼠的肺部病变指数显著低于 CpGODN 组和利巴韦林组。说明人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用具有比人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林单独应用时更好的效果。各组间肺病变指数的比较见表 3。

4. 结论: 人工合成的单链脱氧核苷酸具有明显的抗流感病毒作用, 人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用具有更显著的抗流感病毒作用。

20

实施例 5. CpGODN 人工合成的单链脱氧核苷酸和 CpGODN 人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的抗口蹄疫病毒作用比较

1、人外周血单个核细胞的分离

1) 仪器设备和器材: 同上。

25

2) 试剂和材料: O 型口蹄疫病毒由内蒙古生物制药厂提供, 抗病毒实验在内蒙古生物制药厂进行。肝素抗凝的人全血购自长春市中心血站。聚蔗糖-泛影葡胺: 比重 1.077±0.001, 购自北京鼎国生物技术有限公司。IMDM 培养液: 1000 ml 含庆大霉素 10 万单位。0.22 微米的滤膜抽滤除菌、分装。

3) 方法: 用聚蔗糖-泛影葡胺淋巴细胞分层液分离人外周血的单个核细胞。分层液与肝素抗凝外周血的体积比约为 2:1。水平离心 (1,000 ×g, 20min)。用吸管

30

吸取含单个核细胞的液带，置入另离心管中。加入等体积的无血清培养基。 $1,000 \times g$ 离心 15min，弃上清。重复洗涤两次。弃上清，用 2ml 培养基重悬细胞并进行细胞计数。

5 2、人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的抗口蹄疫病毒作用测定

用含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养液调人外周血单个核细胞的终浓度为 3×10^6 个 / 毫升。加此细胞悬液于 12 孔培养板，每孔 2 ml。加人工合成的单链脱氧核苷酸至终浓度 $6 \mu\text{g/ml}$ 。37°C，5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时，收集上清，检测其抗口蹄疫病毒的活性。

10 设立 CpGODN 组、利巴韦林组、CpG ODN+利巴韦林组、IMDM 对照组。用 5% 胎牛血清 IMDM 调节生长状态良好的 BHK 细胞浓度至 3×10^5 个/ml。将细胞接种于 96 孔平底培养板，每孔 1.3×10^4 个细胞，37°C、5% CO_2 培养 24 小时后，CpGODN 组加入 1:100 稀释的人工合成的单链脱氧核苷酸刺激的人 PBMC 培养上清，利巴韦林组加入利巴韦林（至终浓度 $10 \mu\text{mol/l}$ ），CpG ODN+利巴韦林组加入 1: 100 稀释的 CpG ODN 刺激的人 PBMC 培养上清和利巴韦林（浙江诚意药业有限公司），IMDM 组只加入等量 IMDM。继续培养 1.5 小时后，每孔加入 2% 胎牛血清，IMDM 稀释的口蹄疫病毒液（内蒙生物制药厂）200 μl ，设正常 Vero 细胞对照。37°C、5% CO_2 孵箱培养 44 小时，用结晶紫染色的方法判定细胞病变的程度。吸弃培养液。每孔加 200 μl 0.5% 结晶紫染液，37°C，15 分钟。流水冲掉结晶紫染液。每孔加入 200 微升结晶紫脱色液，振荡器振荡，使染料完全从细胞内脱出，用分光光度计在 540nm 波长测定分光光度值。

25 3.结果：CpG ODN 组和 CpG ODN 与利巴韦林联合应用组相比较，CpG ODN 与利巴韦林联合应用组的 OD 值显著地高于 CpG ODN 组，这一结果说明，人工合成的单链脱氧核苷酸具有明显的抗口蹄疫病毒作用，人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用具有更显著的抗口蹄疫病毒作用。两组间的 OD 值比较见表 4。

30 实施例 6. 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用抗单股正链 RNA 日本脑炎病毒作用比较

1、人外周血单个核细胞的分离同实施例 2。

2、获取 CpG ODN ($6 \mu\text{g/ml}$) 刺激人外周血 PBMC 培养上清同实施例 2。

3、人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的抗单股正链 RNA 日本脑炎病毒作用测定

5 1) 材料：日本脑炎病毒购自长春生物制品所。10% FCS IMDM 完全培养液：同实施例 2。

2) 方法：

用含 10% 小牛血清的 IMDM 培养基调人外周血单个核细胞的终浓度为 3×10^6 个 / 毫升。加细胞悬液于 12 孔培养板，每孔 2 ml。加人工合成的单链脱氧核苷酸至终浓度
10 $6 \mu\text{g/ml}$ 。37℃，5% 二氧化碳孵箱培养 48 小时，收集上清。

设立 CpG ODN 组、利巴韦林组、CpG ODN+利巴韦林组、IMDM 对照组。将生长状态良好的 BHK 细胞（内蒙生物制药厂）接种于 96 孔培养板，每孔 1.3×10^4 个细胞，37℃、5% CO_2 培养 24 小时后，CpG ODN 组加入 1:100 稀释的 CpG ODN 刺激的人 PBMC 培养上清，利巴韦林组加入利巴韦林（至终浓度 $10 \mu\text{mol/l}$ ），CpG ODN+利巴韦林组加入
15 1: 100 稀释的人工合成的单链脱氧核苷酸刺激的人 PBMC 培养上清和利巴韦林（浙江诚意药业有限公司），IMDM 组只加入等量 IMDM。继续培养 1.5 小时后，加入 100 TCID₅₀ / ml 的日本脑炎病毒，同时设正常 BHK 细胞对照，培养 44 小时。在显微镜下观察细胞病变（CPE），出现 25% 的细胞病变记“+”，出现 26-50% 的细胞病变记“++”，出现 51-75% 的细胞病变记“+++”，出现 76-100% 的细胞病变记“++++”。

20 3) 结果（CPE 法）：CpG ODN 组和 CpG ODN 与利巴韦林联合应用组相比较，CpG ODN 与利巴韦林联合应用组的细胞病变显著地低于 CpG ODN 组，这一结果说明，人工合成的单链脱氧核苷酸具有明显的抗日本脑炎病毒作用，人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林联合应用具有更显著的抗日本脑炎病毒作用。两组间的细胞病变的比较见表 5。

25

上述的实验结果表明，本发明的人工合成的单链脱氧核苷酸具有明显的抗日本脑炎病毒的作用，人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林联合应用有更显著的抗日本脑炎病毒的作用。丙型肝炎病毒和登革热病毒、日本脑炎病毒一样同是单股正链的 RNA 病毒，因此，人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用同样可以具有抗丙型肝炎
30 炎病毒的作用。

附表部分

表 1 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的抗滤泡口炎病毒作用比较

CpG ODN	OD 值	
	CpGODN 诱导上清	CpGODN 诱导上清+Ribavirin
1	0.512±0.03	0.908±0.05
2	0.498±0.04	1.120±0.13
3	0.625±0.09	1.340±0.08
4	0.523±0.07	1.180±0.10
5	0.465±0.09	0.988±0.03
6	0.533±0.01	0.877±0.11
7	0.476±0.06	1.005±0.12
8	0.516±0.07	0.998±0.08
9	0.487±0.10	1.560±0.14
10	0.678±0.11	1.345±0.09
11	0.576±0.07	1.123±0.13
12	0.765±0.14	1.407±0.09
13	0.816±0.12	1.654±0.14
14	0.569±0.09	1.213±0.11
15	0.659±0.17	1.457±0.19
16	0.789±0.13	1.345±0.08
17	0.499±0.05	1.180±0.15
18	0.522±0.07	1.398±0.11
19	0.609±0.14	1.478±0.18
20	0.712±0.18	1.589±0.16

IMDM 组 0.213±0.07

利巴韦林组 0.398±0.09

正常 VERO 细胞: 1.625±0.11

表 2 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的抗流感病毒作用比较

CpG ODN	OD 值	
	CpGODN 诱导上清	CpGODN 诱导上清+Ribavirin
1	0.678±0.12	1.412±0.16
2	0.569±0.09	1.345±0.11
3	0.729±0.07	1.456±0.19
4	0.801±0.06	1.678±0.18
5	0.599±0.04	1.342±0.09
6	0.499±0.06	1.234±0.06
7	0.612±0.04	1.367±0.06
8	0.579±0.05	1.258±0.03
9	0.578±0.03	1.298±0.06
10	0.621±0.06	1.312±0.07
11	0.587±0.02	1.199±0.05
12	0.703±0.05	1.389±0.08
13	0.698±0.06	1.378±0.07
14	0.709±0.08	1.409±0.09
15	0.567±0.06	1.298±0.08
16	0.721±0.09	1.476±0.09
17	0.691±0.05	1.309±0.07
18	0.580±0.04	1.199±0.05
19	0.615±0.07	1.099±0.08
20	0.745±0.08	1.305±0.07

DMEM 组 0.245±0.08

利巴韦林组 0.423±0.09

5 正常 VERO 细胞对照 1.328±0.13

表 3 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用抗流感病毒的小鼠体内实验

CpG ODN	细胞病变	
	CpGODN 组	CpGODN +Ribavirin 组
1	++	+
2	++	—
3	++	—
4	+++	+
5	++	—
6	++	—
7	++	—
8	++	—
9	++	—
10	++	+
11	++	—
12	++	—
13	++	—
14	+++	—
15	++	+
16	++	—
17	++	—
18	+++	+
19	++	—
20	++	—

模型组（阴性对照）++++

正常细胞组 —

利巴韦林组 +++

5

表 4 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸与利巴韦林联合应用的抗口蹄疫病毒作用比较

CpG ODN	OD 值	
	CpGODN 诱导上清	CpGODN 诱导上清+Ribavirin
1	0.678±0.08	1.325±0.07
2	0.895±0.09	1.654±0.12
3	0.567±0.05	1.189±0.10
4	0.901±0.10	1.679±0.11
5	0.697±0.09	1.345±0.09
6	0.713±0.06	1.513±0.10
7	0.890±0.09	1.690±0.11
8	0.541±0.06	1.167±0.10
9	0.900±0.14	1.791±0.18
10	0.734±0.06	1.398±0.09
11	0.499±0.04	1.011±0.02
12	0.590±0.05	0.999±0.01
13	0.609±0.08	1.187±0.06
14	0.714±0.06	1.310±0.08
15	0.824±0.12	1.456±0.19
16	0.766±0.11	1.388±0.16
17	0.578±0.09	1.213±0.12
18	0.643±0.07	1.312±0.09
19	0.719±0.06	1.398±0.09
20	0.890±0.09	1.432±0.12

IMDM 组 0.267±0.05

利巴韦林组 0.561±0.09

5 正常 BHK 细胞 1.782±0.14

表5 人工合成的单链脱氧核苷酸和人工合成的单链脱氧核苷酸 N 与利巴韦林联合应用抗单股正链 RNA 日本脑炎病毒作用比较

CpG ODN	细胞病变	
	CpGODN 诱导上清	CpGODN 诱导上清+Ribavirin
1	+	—
2	+	—
3	+	—
4	+	—
5	+	—
6	+	—
7	+	—
8	+	—
9	+	—
10	+	—
11	+	—
12	+	—
13	+	—
14	+	—
15	+	—
16	+	—
17	+	—
18	+	—
19	+	—
20	+	—

IMDM 组++++

利巴韦林组++

5 正常 BHK 细胞 —

权利要求书

1. 一种用于治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的组合物，此组合
5 物包含利巴韦林和人工合成的含CpG的单链脱氧核苷酸。

2. 权利要求1所述的组合物，其中所述人工合成的含CpG的单链脱氧核苷酸具
有下述公式(i)-(v)之一所包含的序列：

(i) $(G)_n(L)_n X_1 X_2 C G Y_1 Y_2 (M)_n (G)_n$ ，其中 $X_1 = A, T, G$ ； $X_2 = A, T$ ； $Y_1 = A, T$ ；
 $Y_2 = A, T, C$ ； $L, M = A, T, C, G$ ； n 为 0-6；

10 (ii) $(G)_n(L)_n C G (X Y)_n C G (M)_n (G)_n$ ，其中 $X = A, T$ ； $Y = A, T$ ； $L, M = A, T, C, G$ ； n 为
0-6；

(iii) $(T C G)_n(L)_n C G (M)_n (G)_n$ ，其中 $L, M = A, T, C, G$ ； n 为 0-6；

(iv) $(T C G)_n(L)_n X_1 X_2 C G (M)_n$ ，其中 $X_1 = A, T, G$ ； $X_2 = A, T$ ； $L, M = A, T, C, G$ ； n 为
0-6；

15 (v) 包含TTCGTTCG的序列。

3. 权利要求1的组合物，其中所述的单链脱氧核苷酸具有SEQ ID NO.1-186之一
所示的序列。

4. 权利要求1或2的组合物，其中所述的人工合成的单链脱氧核苷酸具有SEQ ID
NO:1, 3, 17, 29, 34, 36, 66, 86, 89, 92, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 109, 157, 169, 186之一的序
20 列。

5. 权利要求1-4任一项的组合物，其中所述人工合成的单链脱氧核苷酸的磷酸二
酯键是非硫化的，部分硫化的或完全硫化的。

6. 权利要求1的组合物，其中所述人工合成的单链脱氧核苷酸可被化学修饰。

7. 一种用于治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的试剂盒，其包含
25 人工合成的含CpG单链脱氧核苷酸和利巴韦林，所述单链脱氧核苷酸具有下述公式
(i)-(v)之一所包含的序列

(i) $(G)_n(L)_n X_1 X_2 C G Y_1 Y_2 (M)_n (G)_n$ ，其中 $X_1 = A, T, G$ ； $X_2 = A, T$ ； $Y_1 = A, T$ ； $Y_2 =$
 A, T, C ； $L, M = A, T, C, G$ ； n 为 0-6；

(ii) $(G)_n(L)_n C G (X Y)_n C G (M)_n (G)_n$ ，其中 $X = A, T$ ； $Y = A, T$ ； $L, M = A, T, C, G$ ； n 为
30 0-6；

(iii) (TCG)_n(L)_nCG (M)_n(G)_n, 其中 L,M=A,T,C,G; n 为 0-6;

(iv) (TCG)_n(L)_nX₁X₂CG (M)_n, 其中 X₁=A,T,G; X₂= A,T; L,M=A,T,C,G; n 为 0-6;

(v) 包含TTCGTCG的序列。

5 8. 权利要求7 所述的试剂盒, 其中所述单链脱氧核苷酸具有SEQ ID NO.1-186 之一所示的序列。

9. 权利要求7或8 所述的试剂盒, 其中所述的单链脱氧核苷酸具有SEQ ID NO:1, 3, 17, 29, 34, 36, 66, 86, 89, 92, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 109, 157, 169, 186之一的序列。

10 10. 权利要求7-9 所述的试剂盒, 其中所述单链脱氧核苷酸的磷酸二酯键是非硫化的, 部分硫化的, 或完全硫化的。

11. 权利要求7 所述的试剂盒, 其中所述单链脱氧核苷酸可被化学修饰。

12. 一种治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的方法, 其包含向需要该治疗的患者施用治疗有效量的具有下述公式(i)-(v)之一包含的序列的单链脱氧核苷酸和利巴韦林

15 (i) (G)_n(L)_n X₁X₂CGY₁Y₂(M)_n (G)_n, 其中 X₁=A,T,G; X₂= A,T; Y₁= A,T; Y₂= A,T,C; L,M=A,T,C,G; n 为 0-6;

(ii) (G)_n(L)_nCG(XY)_nCG(M)_n(G)_n, 其中 X=A,T; Y= A,T; L,M=A,T,C,G; n 为 0-6;

(iii).(TCG)_n(L)_nCG (M)_n(G)_n, 其中 L,M=A,T,C,G; n 为 0-6;

20 (iv) (TCG)_n(L)_nX₁X₂CG (M)_n, 其中 X₁=A,T,G; X₂= A,T; L,M=A,T,C,G; n 为 0-6;

(v) 包含TTCGTCG的序列。

13. 权利要求12的方法, 其中所述的单链脱氧核苷酸具有SEQ ID NO.1-186之一所示的序列。

25 14. 权利要求12或13的方法, 其中所述的单链脱氧核苷酸具有SEQ ID NO:1, 3, 17, 29, 34, 36, 66, 86, 89, 92, 94, 95, 97, 98, 99, 102, 109, 157, 169, 186之一所示的序列。

15. 权利要求12-14任一项的方法, 其中所述的单链脱氧核苷酸的磷酸二酯键是非硫化的, 部分硫化的, 或完全硫化的。

16. 权利要求12-14任一项的方法, 其中所述的单链脱氧核苷酸可被化学修饰。

30 17. 权利要求7 所述的试剂盒, 其中所述人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦

林可以同时、顺次或分开施用。

18. 权利要求7 所述的试剂盒，其中所述人工合成的单链脱氧核苷酸的单次应用剂量可为1—5000毫克，所述利巴韦林的单次应用剂量可为300—10000毫克。

19. 权利要求7 所述的试剂盒，其中所述人工合成的单链脱氧核苷酸和利巴韦林的施用方式可为粘膜表面施用，皮下注射，肌肉注射，胃肠施用，腹腔施用和静脉内注射等。

20. 权利要求19的试剂盒，其中所述粘膜表面施用选自呼吸道、消化道和泌尿生殖道黏膜施用。

21. 一种治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的方法，此方法是指向需要该治疗的患者施用有效治疗量的如权利要求1-6任一项所述的组合物。

22. 权利要求12或21所述的方法，其中所述的施用方式可为粘膜表面施用，皮下注射，肌肉注射，胃肠施用，腹腔施用和静脉内注射等。

23. 权利要求1或7 所述的组合物，其中所述病毒是指RNA病毒，DNA 病毒和逆转录病毒，包括流感病毒、口蹄疫病毒、登革热病毒、日本脑炎病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷性病毒和乳头瘤病毒。

24. 权利要求12 所述的方法，其中所述病毒是指RNA病毒，DNA 病毒和逆转录病毒，包括但不限于流感病毒、口蹄疫病毒、登革热病毒、日本脑炎病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷性病毒和乳头瘤病毒。

25. 权利要求1—6任一项的组合物在制备用于治疗或预防病毒感染及病毒感染引起的相关疾病的药物中的应用。

IP060038-SEQUENCE LISTING
SEQUENCE LISTING

<110> 长春华普生物技术有限公司

<120> 人工合成的单链脱氧寡核苷酸和利巴韦林联合应用产生的抗病毒作用

<130> IP060038

<160> 186

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1
ggggtcgttc gtcgttgggg gg 22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2
ggggataacg ttgcgggggg 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3
gggggtgcaac gttcaggggg g 21

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 4
gggtcctac gtaggagggg gg 22

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 5
gggtccatg acgttcctga agggggg 27

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 6
gggggacgtc gccggggggg 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 7
ggatccgtac gcatgggggg 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 8
gggggaatcg attcgggggg 20

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 9
gggatgcatc gatgcatcg gggg 24

IP060038-SEQUENCE LISTING

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

ggtagcgacgt cgcagggggg

20

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

gggacgtacg tcgggggg

18

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

gggggatcga cgtcgatcgg gggg

24

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

ggcgcgcgat cgatcggggg gg

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

ggggtcgatc gatcgagggg gg

22

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

IP060038-SEQUENCE LISTING

<213> 人工序列

<400> 15
ggtcgcgac gcagggggg 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 16
ggggtaacg ttgagggggg 20

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 17
gtcgttttcg tcgacgaatt gggggggg 28

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 18
gtcgttatcg ttttttcgta gggggg 26

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 19
ggcgttaacg acgggggg 18

<210> 20

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 20
gtcggcagc gacggggg 19

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 21
ggtgcgacgt cgaggggg 20

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 22
gtctatttg tacgtacgtg ggg 23

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 23
gacgtcgacg tcgacgtcag gggg 24

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 24
ggggtcgac gttgctagcg ggggg 25

<210> 25
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 25
gggggacgtt atcgtattgg ggggg 25

<210> 26

IP060038-SEQUENCE LISTING

<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 26
ggggtcgtcg ttgtcgtgt gtcgttgggg gg 32

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 27
acgatcgatc gatcgggggg 20

<210> 28
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 28
agacgtctaa cgtcggggg 19

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 29
ggggtcgtgg ccgtcgttgg gggg 24

<210> 30
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 30
ggggtcgttg ccgtcggggg g 21

<210> 31
<211> 24
<212> DNA

IP060038-SEQUENCE LISTING

<213> 人工序列

<400> 31
accggtatcg atgccgggtgg gggg 24

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 32
ttcgttgcat cgatgcatcg ttgggggg 28

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 33
ggggacgata cgtcgggggg g 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 34
ggggacgata tcgatggggg g 21

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 35
ggacgatcga tcgtgggggg 20

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 36

IP060038-SEQUENCE LISTING

tcggggacga tcgtcgggg g 21

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 37
gggggatcga tatcgatcgg gggg 24

<210> 38
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 38
ggatcgatcg atcgatgggg gg 22

<210> 39
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 39
ggtgcatcga tcgatgcagg gggg 24

<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 40
ggtgcatcgt acgatgcagg gggg 24

<210> 41
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 41
ggtgcatcgt atcgcagggg gg 22

<210> 42

IP060038-SEQUENCE LISTING

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 42

gggggggtcg atcgatgggg gg

22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 43

ggggtcgtcg aacgttgggg gg

22

<210> 44

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 44

tgtcgttcct tgtcgtt

17

<210> 45

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 45

ttcgcttcgc ttttcgcttc gctt

24

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 46

accgccaagg agaagccgca ggaggg

26

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 47
tacaacggcg aggaatacc 19

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 48
gtacaacggc gaggaatacc t 21

<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 49
accgtcgttg ccgtcggccc 20

<210> 50
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 50
tgctggccgt cggtt 14

<210> 51
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 51
gtcggcacgc gacg 14

<210> 52
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 52
gtcggcacgc gacgcccccc 20

IP060038-SEQUENCE LISTING

<210> 53

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 53

tcccgtgga cgtt

14

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 54

ttaccggta acgttgccg gcc

23

<210> 55

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 55

accggtaac gttgtcccg ggg

23

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 56

cgttgacgat cgtccatgg cggg

24

<210> 57

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 57

tctgggcct tcgtcg

16

<210> 58

<211> 22

IP060038-SEQUENCE LISTING

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 58

tagtaaccgg tccggcgccc cc

22

<210> 59

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 59

ttgcagcgct gccggtggg

19

<210> 60

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 60

cggcccatcg agggcgacgg c

21

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 61

tcacgcactc tcgagcgttc

20

<210> 62

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 62

atcgtcgact ctcgtgttct c

21

<210> 63

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 63
tgcagcttgc tgcttgctgc ttc 23

<210> 64
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 64
ggtgcgacgt cgcatgat 20

<210> 65
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 65
ggtcgaacgt tcgagatgat 20

<210> 66
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 66
gggggcgtcg ttttcgtcga cgaatt 26

<210> 67
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 67
actcgagacg cccgttgata gctt 24

<210> 68
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 68
aacgttggcg tcgacgtcag cgcc 24

IP060038-SEQUENCE LISTING

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 69

gacgtcgacg ttgacgct

18

<210> 70

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 70

ggcgttaacg ttagcgct

18

<210> 71

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 71

agcgctagcg ctgacggt

18

<210> 72

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 72

ctagacgttc aagcggt

17

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 73

gacgatcgtc gacgatcgtc

20

<210> 74

<211> 24

IP060038-SEQUENCE LISTING

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 74
gtcgttcgta gtcgactacg agtt

24

<210> 75

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 75
aaaagacgtc gacgtcagc tcittt

26

<210> 76

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 76
tgcgacgac gtcgcacgat cggat

25

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 77
tgcgacgtcg cacagcgt

18

<210> 78

<211> 13

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 78
tcgttgccgt cgg

13

<210> 79

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 79 tcgttgccgt cggg	14
<210> 80	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 80 tcgttgccgt cgggg	15
<210> 81	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 81 tcgttgccgt cggggg	16
<210> 82	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 82 tcgttgccgt cgggggg	17
<210> 83	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 83 tcgttgccgt cggggggg	18
<210> 84	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 84 tcgttgccgt cgggggggg	19

IP060038-SEQUENCE LISTING

<210> 85

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 85

tcgttgccgt cggggggggg

20

<210> 86

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 86

tcgtcgggtg catcgatgca gggggg

26

<210> 87

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 87

tcgtcgggtg caacgttgca gggggg

26

<210> 88

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 88

tcgtcgggtg cgtcgacgca gggggg

26

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 89

tcgtcgggtg cgatcgagg gggg

24

<210> 90

<211> 30

<212> DNA

IP060038-SEQUENCE LISTING

<213> 人工序列

<400> 90
tcgtcgggtg cgacgatcgt cgcagggggg 30

<210> 91

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 91
tcgtcgtgcg acgtcgcagg gggg 24

<210> 92

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 92
tcgtcgcaga acgttctggg ggg 23

<210> 93

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 93
tcgtcgcacg tcgcaggggg g 21

<210> 94

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 94
tcgtcgcacg atcgtcgag ggggg 25

<210> 95

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 95
tcgtatgcat cgatgcatag ggagg 25

<210> 96
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 96
tcgtgcatcg atgcaggggg g 21

<210> 97
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 97
tcgaaacgtt tcgggggg 18

<210> 98
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 98
tcggacgata gtcgggggg 19

<210> 99
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 99
tcgagcgata gtcgagggg gg 22

<210> 100
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 100
tcgtcgcttt gtcgttggg 20

<210> 101

IP060038-SEQUENCE LISTING

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 101

tcgtcgtttt gtcgttgggg

20

<210> 102

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 102

tcgtcgggtg cgacgtcgca gggggg

26

<210> 103

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 103

tcgtcgggtg cgacgatcgt cggggg

27

<210> 104

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 104

tcgtcgtttg catcgatgca gggggg

27

<210> 105

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 105

tcgtcgtttt gacgatcgtc gggggg

26

<210> 106

<211> 15

<212> DNA

IP060038-SEQUENCE LISTING

<213> 人工序列

<400> 106
tcgttcgggg tgccg 15

<210> 107

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 107
tcgttcgggg taccgatggg g 21

<210> 108

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 108
tcgttcgct cccatgccgg gggg 24

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 109
tcgtcgttc gtcgttgggg 20

<210> 110

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 110
tcgttgcgt ttcgctgccg gggggg 27

<210> 111

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 111

IP060038-SEQUENCE LISTING

tgcttgggtg gcagctgccca gggggg 26

<210> 112
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 112
tgctgtttg ctgcttgggg 20

<210> 113
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 113
aacgttcgac gtcgaacggg gggg 24

<210> 114
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 114
aacgacgacg ttggggg 17

<210> 115
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 115
tcgtaacgtt gtttttaacg tt 22

<210> 116
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 116
tcgtcgtata cgacgatcgt t 21

<210> 117

IP060038-SEQUENCE LISTING

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 117
tcgtcgtttg cgttgcgtt

20

<210> 118

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 118
tcctgctcgtt ttgtcgtt

18

<210> 119

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 119
tcgtcgttgt cgttcgct

18

<210> 120

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 120
tcgtcgttac cgatgacgtc gccgt

25

<210> 121

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 121
tcgtcgtttg catcgatgca gtcgtcgtt

29

<210> 122

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 122
tcgcctcgtc gccttcgagc g 21

<210> 123
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 123
tcgtgtgcgt gccgttgagt 20

<210> 124
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 124
tcgtcgaggc cgccggtagc 20

<210> 125
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 125
tcgtcgccgg tgggggtgtg 20

<210> 126
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 126
tcgtcgtacg caattgtctt 20

<210> 127
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 127
tcgcccaccg gtgggggggg 20

IP060038-SEQUENCE LISTING

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 128

tcgtcgcaga ccggtctggg g

21

<210> 129

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 129

tcgtcgcggc cggcgcccc

20

<210> 130

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 130

tcgtcgcggc cgcgaggggg

20

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 131

tcgaggacaa gattctcgtg c

21

<210> 132

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 132

tcgaggacaa gattctcgtg caggcc

26

<210> 133

<211> 21

IP060038-SEQUENCE LISTING

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 133
tcgtgcaggc caacgaggcc g

21

<210> 134

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 134
tcgttgccgt cggccc

16

<210> 135

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 135
tcggcacgcg acgtgctggc cgtcgtttcc

30

<210> 136

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 136
tcgttgccgt cggccccccc cc

22

<210> 137

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 137
tcgttgccgt cggccccccc

19

<210> 138

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 138 tcgttgccgt cggccccc	18
<210> 139	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 139 tcgttgccgt cggccccc	17
<210> 140	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 140 tcgttgccgt cggccccccc	20
<210> 141	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 141 tcgaggacaa gattctcgt	19
<210> 142	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 142 tcggcacgcg acgtgctggc cgtcgtt	27
<210> 143	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 143 tcgtcgcgcc gtcacggggg g	21

IP060038-SEQUENCE LISTING

<210> 144

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 144

tcgtgtgcgt gccgttggg

19

<210> 145

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 145

tcgtcgccgt tgggcggg

18

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 146

tcgtcgacgt cgttgggcgg g

21

<210> 147

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 147

tcgcagttgt cgtaacgttg ggcggg

26

<210> 148

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 148

tcgtcgttgg tatgtt

16

<210> 149

<211> 20

IP060038-SEQUENCE LISTING

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 149

tcgtcgtcgt cgttgcgtt

20

<210> 150

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 150

tcgtcgtcgt cgttgcgtt gggg

24

<210> 151

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 151

tcgttcgggg tgccg

15

<210> 152

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 152

tcgttcgggg taacgatt

18

<210> 153

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 153

tcgttcgggg taacgatt

17

<210> 154

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 154
tcgttcgggg taccgat 17

<210> 155
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 155
tcgtacggcc gccgtacggc ggg 23

<210> 156
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 156
tcgctcgac tcccctcgag ggg 23

<210> 157
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 157
tcgtcgtcga ctcggtgctg gggg 24

<210> 158
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 158
tcgggcgccc gatcgggggg 20

<210> 159
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 159
tcgtcggctt ttcgaaatt 19

IP060038-SEQUENCE LISTING

<210> 160

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 160

tcgtgacgtc ctcgagtt

18

<210> 161

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 161

tcgtcttttcg actcgttctc

20

<210> 162

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 162

tcgtcgtttt gcgttctc

18

<210> 163

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 163

tcgacttttcg tcgttctgtt

20

<210> 164

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 164

tcgtcgtttc gtcgttctc

19

<210> 165

<211> 20

<212> DNA

IP060038-SEQUENCE LISTING

<213> 人工序列

<400> 165
tcgtcgtcgt cgttgcgtt 20

<210> 166

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 166
tcgttctcga ctcgttctc 19

<210> 167

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 167
tcgacgttcg tcgttcgtcg ttc 23

<210> 168

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 168
tcgtcgcacgt cgttcgttct c 21

<210> 169

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 169
tcgtcgcacg tcgcagatga t 21

<210> 170

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

IP060038-SEQUENCE LISTING

<400> 170
tcgtcgagcg ctcgatcgga t 21

<210> 171
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 171
tcgtcgtttc gtagtcgttg acgtcggg 28

<210> 172
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 172
tcgtcggacg ttttccgacg ttct 24

<210> 173
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 173
tcgtcgtttt cgtcgttttc gtcgtt 26

<210> 174
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 174
tcgtcgtttg tcgtgtgtcg tt 22

<210> 175
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 175
tcgtcgtttg tcggggtcgt tggggtcgtt 30

<210> 176

IP060038-SEQUENCE LISTING

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 176
tcgtcgtttc gtcctcgtt

20

<210> 177

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 177
tcgtcgtttt gctgcgtcgt t

21

<210> 178

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 178
tcgagcgttt tcgctcgaat t

21

<210> 179

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 179
ttcgtcgttt gatcgatgtt cgttgggggg

30

<210> 180

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 180
ttcgtcgttg tgatcgatgg gggg

24

<210> 181

<211> 28

<212> DNA

IP060038-SEQUENCE LISTING

<213> 人工序列

<400> 181
tatcgatgtt ttcgtcgtcg ttgggggg 28

<210> 182

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 182
tcgactttcg tcgttcgtt 20

<210> 183

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 183
tcgtcgtttc gtcgttctc 19

<210> 184

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 184
tcgacgttcg tcgttcgtcg ttc 23

<210> 185

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 185
tcgtcgtttt cgtcgttttc gtcgtt 26

<210> 186

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 186

tcgtcgggtg cgacgtcgca

IP060038-SEQUENCE LISTING

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000667

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 12-16, 21-22 and 24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
These claims are directed to methods of treatment of the human/animal body, thus they relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5 and 10
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000667

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁸ A61K31, C07H, A61P11, A61P31

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, PAJ, CPRS, CNKI, CA, MEDLINE, CpG, RNA, single-stranded, oligodeoxynucleotide?, virus+, ribavirin+, virazole, combin+

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN,A,1569881 (CHANGCHUN HUAPU BIO TECH CO LTD) 26.Jan. 2005 (26.01.2005), claims 1-6 and pages 1-2 of the description	1-4,6-9,11,17-20,23,25
Y	CN,A,1526718 (CHANGCHUN HUAPU BIO TECH CO LTD) 08.Sept. 2004 (08.09.2004), claims 1-7 and pages 1-7 of the description	1-4,6-9,11,17-20,23,25
Y	WO,A1,2005016370 (SMITH & ASSOC PTY LTD HOWARD) 24.Feb 2005 (24.02.2005), claims 1-43 and pages 1-9 of the description	1-4,6-9,11,17-20,23,25
A	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol.48, No.6, 2004, Vollmer et al., "Immunopharmacology of CpG Oligodeoxynucleotides and Ribavirin", page2314 - page2317	1-4,6-9,11,17-20,23,25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
07.Jul.2006 (07.07.2006)

Date of mailing of the international search report
03 · AUG 2006 (03 · 08 · 2006)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

WANG Boli

Telephone No. 86-10-62085225

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/000667

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN,A,1569881	26.Jan.2005 (26.01.2005)	WO,A1,2005014611	17.Feb.2005(17.02.2005)
		CN,A,1590399	09.Mar.2005(09.03.2005)
CN,A,1526718	08.Sept.2004 (08.09.2004)	NONE	
WO,A1,2005016370	24.Feb.2005 (24.02.2005)	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000667

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/7084(2006.01) i

A61K31/7088(2006.01) i

A61K31/7056(2006.01) i

A61P11/00(2006.01) i

A61P31/12(2006.01) i

A61P31/14(2006.01) i

A61P31/16(2006.01) i

A61P31/18(2006.01) i

A61P31/20(2006.01) i

C07H21/04(2006.01) n

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2006/000667

第II栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第1页第2项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. ☒ 权利要求: 12-16、21-22 和 24

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

权利要求 12-16、21-22 和 24 涉及一种治疗疾病的方法, 它们是以有生命的人或动物为直接实施对象, 以疾病的治疗为目的的技术方案, 根据 PCT 条约第 17 条 (2) (a) (i) 和实施细则 39.1(iv), 属于国际检索单位不需要检索的主题。

2. ☐ 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:

3. ☒ 权利要求: 5 和 10

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III栏 关于缺乏发明单一性的意见(接第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. ☐ 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: ☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

☐ 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2006/000667

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC⁸ A61K31, C07H, A61P11, A61P31

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, PAJ, CPRS, 清华同方数据库, CA, MEDLINE, 脱氧, 寡核苷酸, 单链, 病毒, 利巴韦林, CpG, RNA, oligodeoxynucleotide?, virus+, ribavirin+, virazole, combin+

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN,A,1569881 (长春华普生物技术有限公司) 26.1 月 2005 (26.01.2005), 权利要求 1-6 和说明书第 1-2 页	1-4, 6-9, 11, 17-20, 23, 25
Y	CN,A,1526718 (长春华普生物技术有限公司) 08.9 月 2004 (08.09.2004), 权利要求 1-7 和说明书第 1-7 页	1-4, 6-9, 11, 17-20, 23, 25
Y	WO,A1,2005016370 (SMITH & ASSOC PTY LTD HOWARD) 24.2 月 2005(24.02.2005), 权利要求 1-43 和说明书第 1-9 页	1-4, 6-9, 11, 17-20, 23, 25
A	ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Vol.48, No.6, 2004, Vollmer 等, "Immunopharmacology of CpG Oligodeoxynucleotides and Ribavirin" 第 2314-2317 页	1-4, 6-9, 11, 17-20, 23, 25

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

07.7 月 2006 (07.07.2006)

国际检索报告邮寄日期

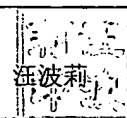
03. 8 月 2006 (03. 08. 2006)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员



电话号码: (86-10)62085225

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/000667

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN,A,1569881	26. 1 月 2005 (26.01.2005)	WO,A1,2005014611 CN,A,1590399	17. 2 月 2005(17.02.2005) 09. 3 月 2005(09.03.2005)
CN,A,1526718	08. 9 月 2004 (08.09.2004)	无	
WO,A1,2005016370	24. 2 月 2005 (24.02.2005)	无	

主题的分类

A61K31/7084(2006.01) i
A61K31/7088(2006.01) i
A61K31/7056(2006.01) i
A61P11/00(2006.01) i
A61P31/12(2006.01) i
A61P31/14(2006.01) i
A61P31/16(2006.01) i
A61P31/18(2006.01) i
A61P31/20(2006.01) i
C07H21/04(2006.01) n